

2022/07/14

高分子量タンパク質の全カルボキシル基解離定数の計測

創価大学

池口雅道

1. 成果の概要 (1~2 ページ)

実施内容

本研究課題では哺乳類のミルク中に多量に存在する β ラクトグロブリン(LG)という分子質量18KDaのタンパク質の機能解明を長期目標として設定し、NMRを用いてウマ β ラクトグロブリン(ELG)の解離基のpKaを測定し、pHに依存した立体構造変化と機能との関係を明らかにすることを目的とした。ELGは大腸菌での大量発現系が構築されており、すでに主鎖、側鎖の ^1H , ^{13}C , ^{15}N の帰属は完了し、NOE情報に基づいた立体構造も明らかとなっている。

日本電子と共同で、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)選択的にHbあるいはHgとカルボキシル基の炭素との相関信号を検出する二次元HCCOのパルスシーケンスを開発した。また、CbあるいはCgの化学シフトでさらに展開した三次元HCCOも開発した。大学に設置されている日本電子ECA-500分光計を用いて、ELGの滴定実験を行ったが、ELGには11個のAsp残基と16個のGlu残基が存在し、ピークのオーバーラップが激しいため、三次元測定は必須であった。

そこで理研のECA-800を用いて感度・分解能の向上、測定時間の短縮が可能か、持ち込んだHCCOパルスシーケンスをテストした。

本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較

800MHzの装置での測定結果は大学が所有する500MHzの装置での測定結果に比して格段に良好なものとは言えなかった。

今後の展開、課題

多数のpHのサンプルを用意して測定を繰り返す滴定実験という実験の性質上、一つのpHでの測定時間は短いのが望ましい。したがって三次元スペクトルではなく、二次元スペクトルで十分な分解能を有することが望まれる。ELGのようにAsp, Gluの多いタンパク質の場合、HbあるいはHgでの観測では二次元スペクトルによる十分な分離は困難である。主鎖アミドプロトンを使った検出方法の開発が考えられる。

2. 利用における感想(改善要望等を含む)

結果的には本申請での使用はトライアル利用が適していたが、三次元測定の場合、最大3日までの使用では厳しい面もあるため、トライアル利用で1週間使えると良い。また大学の研究者にとって現行の利用料金は決して安価とは言えない。成果非占有利用の利用料金見直しを検討してほしい。

3. 利用周辺環境に関する希望

特に無い

4. 今後の利用予定

研究過程において高磁場の装置が必要となれば、新規に課題申請をすることは有り得るが、今の所、予定は無い。

5. 今後期待するその他のサービス

特に無い

6. その他

特に無い

7. 利用実施時期及び期間

2011年2月21日～2011年2月28日

当初計画変更

800MHzの装置での測定結果は大学が所有する500MHzの装置での測定結果に比して必ずしも優位とは言えなかったため、費用対効果の観点から利用を中断した。

8. 利用研究基盤

溶液 800MHz 2011年02月21日～2011年2月28日 (7日間)